

## 25 動物遺伝資源の特性評価のためのマイクロサテライトDNAの効率的単離法

[要約] 動物遺伝資源の特性評価に資するため、マイクロサテライトDNAのゲノム中コピー数が少ない家禽において、pCR-Scriptベクター、点変異導入法およびmung beanヌクレアーゼを組み合わせることによってその効率的単離法を開発した。

農業生物資源研究所 遺伝資源第一部 動物探索評価研究チーム				連絡先	0298-38-7041
部会名	畜産	専門	育種	対象	家禽類
分類	研究				

## [背景・ねらい]

マイクロサテライトDNAは、数塩基の配列が繰り返しているもので、その代表としてCAリピートがある。マイクロサテライトDNAは、各染色体に広く分布し、対立遺伝子(allele)数が多いことから遺伝子マーカーとして哺乳動物の遺伝解析に広く用いられている。ところが家禽においては、既知のマイクロサテライトDNAマーカーは少ない。また、家禽のマイクロサテライトDNAの1ゲノムあたりのコピー数は、哺乳動物の約10分の1と少なく、これまでの方法では新たなマイクロサテライトDNAのクローニングにかなりの時間と労力を要する。本研究では、マイクロサテライトDNAを応用した動物遺伝資源の遺伝特性評価に資するため、マイクロサテライトDNAの効率的なクローニング法を開発する。

## [背景・ねらい]

1. 点変異導入法(Kunkelら, 1988)の操作手順を哺乳動物のマイクロサテライトDNAのクローニングに応用した方法(Ostranderら, 1992)を改変し、家禽のマイクロサテライトDNAの効率的なクローニング法を開発した(図1)。
2. その結果、Ostrander(1992)の方法をそのまま家禽に応用した場合より、30倍以上効率的にマイクロサテライトDNAを単離できる(表1)。
3. この方法では、PCR産物クローニング用に開発されたプラスミドベクターpCR-Script(Stratagene)を使用することにより、脱リン酸化処理を施したDNA断片のクローニング効率を上げ、さらに大腸菌XL1-Blue MRF'を使用することによって形質転換効率を上げた。これによって、プライマー伸長反応に供与するクローニング数を飛躍的に増加させた。
4. CAリピートを含むクローニングを選択する目的で、調製した一本鎖DNA、(CA)<sub>n</sub>オリゴヌクレオチド、dNTP、耐熱性ポリメラーゼを混合し、高温下でプライマー伸長反応を行った。その後、一本鎖DNA特異的分解酵素であるmung beanヌクレアーゼを作用させることで、二本鎖DNAを効率的に選別することを可能にした。

## [成果の活用面・留意点]

本法で単離されたマイクロサテライトDNAは、家禽遺伝資源の特性評価に利用できる。また本法は、他の動物種においてもマイクロサテライトDNAの効率的クローニング法として応用できる。

【具体的データ】

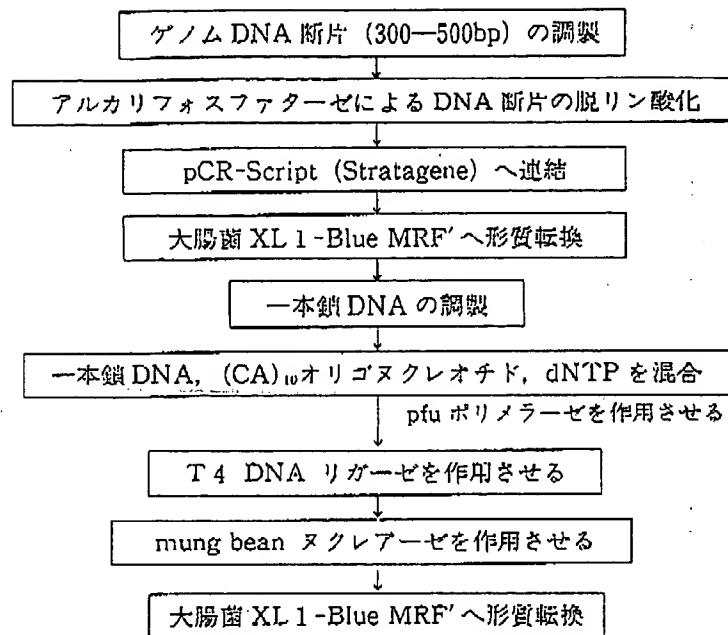


図1 マイクロサテライトDNAのクローニング手順

表1 従来法との効率比較

	今回の方法	Ostranderらの方法*
(CA) <sub>10</sub> 陽性クローンの割合	70%	2.1%
平均CA繰り返し回数	13.3回	7.8回

(\* Cheng & Crittenden, 1994)

【その他】

研究課題名：動物遺伝資源評価のためのDNA多型マーカーの開発

予算区分：経常

研究期間：平成7年度（平成6～8年度）

研究担当者：高橋秀彰, 蕤澤圭二郎, 古川 力

発表論文等：1) Takahashi *et al.*: Efficient cloning method to detect micro-satellite markers in chickens, 第20回ベルツビルシンポジウム講演要旨, p32 (1995)  
 2) 高橋秀彰ら：多型DNAマーカーの効率的クローニング法の検討, 第90回日本畜産学会大会講演要旨, p177 (1995)  
 3) 高橋秀彰ら：ニワトリのマイクロサテライトDNAマーカー単離の効率化, 平成7年度日本家禽学会秋季大会講演要旨, p11 (1995)